

Rejection of Claims 4, 6 and 7 Under 35 U.S.C. §102(a)

The Examiner maintains the rejection of claims 4, 6 and 7 under 35 U.S.C. 102(a) as allegedly being anticipated by EP 0 993 834 A1 to Hirai et al. ("Hirai"). The Examiner asserts that Hirai's putative method of TSST-1 removal from body fluids by an adsorbent anticipates the claimed method for adsorptive removal of an enterotoxin in a body fluid. The Examiner alleges that TSST-1 and the claim recitation "enterotoxin" are well known in the art to belong to a family of superantigens and that there is "96% agreement between the PCR results for detecting Staphylococcal enterotoxin D and TSST-1" (Final Office Action of 8/27/02, p. 3, line 20 to p. 4, line 4). Applicants respectfully disagree.

"[F]or, anticipation under 35 U.S.C. 102, the reference must teach each and every aspect of the claimed invention either explicitly or impliedly." MPEP 706.02. Hirai does not teach any methods for adsorptive removal of an enterotoxin in a body fluid either explicitly or impliedly. TSST-1 is simply, not an enterotoxin. First, TSST-1 is of a different size (i.e. 22kDa) than enterotoxins (i.e. about 26 to about 28kDa) See previous Response under 37 C.F.R. §1.111 filed June 10, 2002.

Second, TSST-1 and enterotoxins diverge structurally. The enclosed Toxicosis Study teaches that when properly aligned, TSST-1 shares a negligible amount of identity with enterotoxins (See Exhibit A: Figure 2 of Toxicosis Study, 2:385-391, 1989 at p. 388). As shown in figure 2 on page 338, TSST-1 shares an identical amino acid residue at about 11 places with at least one of 5 exemplary enterotoxins over a span of 236 amino acids. Alternatively, Mehrotra et al., J. Clinical Microbiol, March 2000, 1032-1035, states that "enterotoxins are small peptides (26 to 29kDa) and have a great deal of similarity at the amino acid level." More specifically, enterotoxins have the conserved amino acid sequence CMYGGXT in which X is V or I at residues 106-112 (See Exhibit A: Figure 2 of Toxicosis Study, at p. 388). Alternatively, TSST-1 has the non-identical amino acid residues IHFQISG and lack cysteine all together in positions 106-112. Given the difference in size and the well documented structural divergence between enterotoxins and TSST-1, the skilled artisan would not consider TSST-1 to be an "enterotoxin".

As such, Hirai does not anticipate the claimed invention.

Moreover, Hirai, neither alone or in combination with the other references cited by the Examiner, renders the claimed invention unpatentably obvious.

To establish a *prima facie* case of obviousness, three basic criteria must be met. First, there must be some suggestion or motivation, either in the references themselves or in the knowledge generally available to one of ordinary skill in the art, to modify the reference or to combine reference teachings. Second, there must be a reasonable expectation of success. Finally, the prior art reference (or references when combined) must teach or suggest all the claim limitations. The teaching or suggestion to make the claimed combination and the reasonable expectation of success must both be found in the prior art, and not based on applicant's disclosure. *In re Vaeck*, 947 F.2d 488, 20 USPQ2d 1438 (Fed. Cir. 1991); MPEP 2142.

The Examiner cites McLauchlin et al., (*J. Food Prot.* 2000 Apr; (63): 479-88), (hereinafter "McLauchlin") for the proposition that TSST-1 and enterotoxins are interchangable with respect to claim 4 by stating that there is "96% agreement between the PCR results for detecting Staphylococcal enterotoxin D and TSST-1" (Final Office Action of 8/27/02, p. 3, line 20 to p. 4, line 1). However, the Examiner has wholly failed in explaining how 96% agreement in PCR results for detecting Staphylococcal enterotoxin D and TSST-1 would motivate one of ordinary skill in the art to substitute enterotoxins for TSST-1 in Hirai's method.

The Examiner's quote that there is "96% agreement in PCR results for detecting Staphylococcal enterotoxin D and TSST-1" teaches nothing about the physical similarity between TSST-1 and enterotoxin D or any other enterotoxin. McLauchlin teaches a PCR-based procedure for the detection of DNA fragments of staphylococcal enterotoxins (SEs) and TSST-1 genes of *Staphylococcus aureus* in cultures recovered from food poisoning incidents. As such, McLauchlin detected nucleic acid fragments of the genes encoding SEs and TSST-1 protein in these cultures using distinct toxin gene-specific oligonucleotide primer pairs. Eight distinct oligonucleotide primer pairs amplified various enterotoxin gene fragments and one distinct oligonucleotide primer pair was used to detect TSST-1 gene fragments. They then independently analyzed the cultures for SEA-D and TSST-1 protein expression by a commercial reverse latex

agglutination assay kit. The investigators found that when a particular culture sample was positive for SEA-D and TSST-1 gene fragment PCR amplification, the presence of the gene's corresponding protein product was confirmed 96% percent of the time as detected by its respective reverse latex agglutination assay. Accordingly, there is nothing in McLauchlin to suggest any structural similarity between enterotoxin and TSST-1 protein.

In fact McLauchlin teaches away from the claim 4 in that distinct toxin gene-specific oligonucleotide primer pairs are used to distinguish between enterotoxins and TSST-1 gene fragments and that different commercial kits (See p. 480, left column, SET-RPLA, Product Code TD940, Oxoid, for SEA-D and TSST-1-RPLA Product Code TD940, Oxoid, for TSST-1) are used to distinguish between enterotoxin and TSST-1 protein contamination.

The Examiner further alleges that TSST-1 and the claim recitation "enterotoxin" are well known in the art to belong to a family of superantigens. The fact that enterotoxins and TSST-1 are classified as "superantigens" provides no teaching to one of skill in the art, that they share any structural similarity. According to Schlievert, J. Infect. Dis. 1993 May; 167(5): 997-1002, (hereinafter "Schlievert"), superantigens:

[I]nclude bacterial products (mainly of streptococci and staphylococci) that stimulate T-cells to proliferate nonspecifically through interaction with class II major histocompatibility complex products on antigen-presenting cells and then with the variable regions on the beta chain of the T cell. (See Abstract)

This is a purely functional definition of a class of proteins framed with respect to a physiological result achieved by the protein members of the class. Therefore, the fact that enterotoxins and TSST-1 are in the same class of "superantigens" is of no relevance with respect to the alleged commonality of their actual structure. As such, the "superantigen" co-classification provides no teaching, suggestion or contemplation that the method taught by Hirai could in any way provide a method for adsorptive removal of an enterotoxin in a body fluid comprising contacting an enterotoxin-containing body fluid with an enterotoxin adsorbent to adsorb and remove the enterotoxin, the adsorbent comprising a compound with a log P, in which P represents a partition

coefficient in an octanol-water system, value of not less than 2.50 as immobilized on a water-insoluble carrier.

Accordingly, Hirai's putative method of TSST-1 removal from body fluids by an adsorbent neither anticipates, nor renders unpatentably obvious the claimed method for adsorptive removal of an enterotoxin in a body fluid. Hirai does not teach, suggest or contemplate any methods for removing enterotoxins as recited in claim 4. For at least the reasons stated above, Applicants respectfully request withdrawal of this rejection. Applicants respectfully submit that claims 6 and 7, which depend from claim 4, are allowable for at least the same reasons as claim 4.

CONCLUSION

It is respectfully submitted that the present application is now in condition for allowance, which action is respectfully requested. The Examiner is invited to contact Applicants' representative to discuss any issue that would expedite allowance of the subject application.

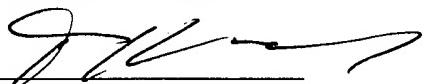
It is not believed that any extensions of time or other fees are required in connection with the filing of this response. However, if any fees for extension(s) of time or additional fees are required in connection with the filing of this response, such extensions of time are hereby petitioned under 37 C.F.R. § 1.136(a), and the Commissioner is authorized to charge any such required fees or to credit any overpayment to Kenyon & Kenyon's Deposit Account No. 11-0600.

Respectfully submitted,

KENYON & KENYON

Dated: Nov. 27, 2002

By:


Thomas A. Haag, Ph.D.
(Reg. No. 47,621)

1500 K Street, N.W.
Washington, D.C. 20005
(202) 220-4200
(202) 220-4322 (direct)

Translation of Toxicosis study, Vol.2, page.388, Fig.2,
1989

SEA	1	10	20	30	40	50		
SEB	*	SEKSEEINEXKDLRKK	MELQGTALC	-SLKNIYY	-YNEKAKT	-ENKE		
SEC	*	SQPDPKPDE	-H-SMKPT	-LME- SM	-VL-	DDNHVSA-1		
SEE	*	SQPDPTPDE	-H-A SM KPT	-LME- SM	-VL-	DDHYVSA-TKV		
SPE A	*	QQDPDPD	HRSS	VKQ	FL	EGDPVH		
TSST-1			*	RN S- SM R	-I-	VKSV		
						LNS		
SEA	60	70	80	90	100	110	120	130
SEB	TILFKGFFTDHSWENDLLVD	PDSKDIVDKY	NCKK	LY	-A-----	YYGY-Q		
SEC	DLIYSIXD	KLCN	DNVR	E KN	LA	D Y	-N Y-	
SEE	D YNISDKKLKN	DKVKT	ELLNEGLAK	DEV	V	-SNYYVN	FSSKD	
SPE A	DLIYN--	VSGPN	DK KTELKNQ	EMATLPFD	N	I	HL	
TSST-1	M-----	RIKNTDGSI	IIFPSPYSPAFT	E	N-----	T	KRT-K	
SEA	140	150	160	170	180	190		
SEB	VPLSTVK	N	V	QAGRY	QEKYN	NSDV	DCKQNT	
SEC	LSPD-Q	DKA	YLT	H	VKNKK	2F	-NSPYET	
SEE	ISP-Q	S	A	IK	NP	EFN	--SSPY	
SPE A	IDK-	S	S	H	H	FC	S G	
TSST-1	LSPD-I	E	M	YKVEK	TDNKQ	TNGP	-S	YET
								IPKN
SEA	200	210	220	230				
SEB	EPSVNY	SLPGAGQQ	-YSNT-L	R126	RE	IN	PMHDIXY	S*
SEC	N FW	MMP	P	DKFDQSKY	MVDE	KDV	EV	T
SEE	GNTFW	MMP	P	DKFDQSKY	MVDE	KSV	EV	K*
SPE A	GST	D	-PD	-	VDE	L	L	
TSST-1	KE FW	PEPEF	-TQSK-Y	M	LD	NTSQ	EV	T
	Y---QS	SKKPEY	-NT	TEK	BA	IN		

SEA: enterotoxin A, SEB: enterotoxin B, SEC1: enterotoxin C1, SEE: enterotoxin E, SPE A: Streptococcus pyretic toxin, TSST-1: toxic shock syndrome toxin-1
 Fig.2 Comparison of amino acid sequences of enterotoxin A, other type enterotoxins and similar toxins

特集 自然毒(3)～菌類毒～

細菌毒

五十嵐英夫

東京都立衛生研究所微生物部副参事研究員

はじめに

細菌毒も自然毒の範疇に入りますが、その領域は一冊の本にもなるような広範囲にわたり、私がひとりでその領域をカバーすることはとても困難なことです。この特集を企画された先生方は、外毒素型の細菌性食中毒の起因毒素のみを細菌毒と想定されているのではないだろうかと考えまして、その方向でまとめてみることにしました。

細菌性食中毒は種々の細菌によって惹起される。その発病の機作によって、大きく感染型と外毒素型の二つにわけて考えられている。最近では、この分類に当てはまらない食中毒の発症機序もみられている。

感染型は、飲食物とともに摂取された病原性微生物が生体内で増殖し、產生された毒性物質によって発病するもので、多くは発熱を伴う。感染型の主な原因菌は、サルモネラ、腸炎ビブリオ、病原性大腸菌、カンピロバクター、セレウス菌などである。毒素型は、食物を汚染した細菌が増殖する際に產生された毒素を含む飲食物を喫食することによって発病するものである。毒素型の主な原因菌は、黄色ブドウ球菌やボツリヌス菌などである。

以上のように、細菌性食中毒は、その原因となる細菌の產生する毒素や毒性物質によって惹起される。本稿の主題である細菌毒という言葉には、上記の細菌が產生する毒素や毒性物質がすべて含まれていると考えられる。しかし、こ

れらのすべてを1人の著者が執筆することは不可能である。そこで本稿では、外毒素型の細菌性食中毒であるブドウ球菌食中毒とその起因物質であるブドウ球菌エンテロトキシン（以下、エンテロトキシンと略す）について記述する。黄色ブドウ球菌以外の細菌性食中毒とその毒素については、新たな企画が予定されているとのことですのでそれを参照されたい。

1. ブドウ球菌食中毒の発生状況

表1は、東京都内において、最近5年間に発生した食中毒の発生状況を病因別にまとめたものである¹⁾。表からも明らかなように、毎年の発生状況は多少異なるが、細菌性食中毒は、発生件数および患者数ともに化学性食中毒に比べて圧倒的に多い。最近5年間で発生件数の多い中毒を順を追ってみると、第1位が腸炎ビブリオ、第2位が黄色ブドウ球菌で、以下サルモネラ、カンピロバクター・ジェシュニ／コリー、セレウス菌、病原大腸菌である。このように、ブドウ球菌食中毒は、発生件数および患者数においても、腸炎ビブリオに次いで多く発生している細菌性食中毒である。しかし、本菌食中毒は年次的に発生件数および患者数ともに減少傾向を示している。

表2は、東京都内において、最近5年間に発生したブドウ球菌食中毒を原因食品別にまとめたものである¹⁾。原因食品別にみてみると、にぎりめし、弁当が多く、最近5年間で78件中51件（65.4%）であった。

表1 東京都における最近5年間の病因別食中毒の発生状況(1984年~1988年)

区別	年度	1984年		1985年		1986年		1987年		1988年		計	
		件数	患者数	件数	患者数								
細菌	腸炎ビブリオ	41	499	49	953	32	1,739	25	1,085	25	330	172	4,606
	黄色ブドウ球菌	24	1,019	13	129	19	243	13	153	9	58	78	1,602
	サルモネラ	13	70	8	82	10	249	7	158	11	125	49	684
	病原大腸菌	2	448	3	22	3	53	—	—	3	35	11	558
	ポツリヌス菌	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ウエルシュ菌	3	292	1	62	1	29	—	—	5	701	10	1,084
	バチルス・セレウス	3	17	1	27	4	32	6	380	—	—	14	456
	カンピロバクター・ ジエシニコリ	5	110	6	903	1	30	5	135	4	1,026	21	2,204
	黄色ブドウ球菌 サルモネラ菌属・バチルスアルビアリス混合	1	4	1	70	—	—	—	—	—	—	2	74
	植物性自然毒	2	9	—	—	1	5	—	—	—	—	3	14
化学生	動物性自然毒	—	—	2	4	—	—	—	—	1	1	3	5
	その他の	2	8	1	14	—	—	1	8	—	—	4	30
	不明	26	894	21	1,070	26	430	17	156	10	139	100	2,689
計		122	3,370	106	3,336	97	2,810	74	2,075	68	2,415	467	14,006

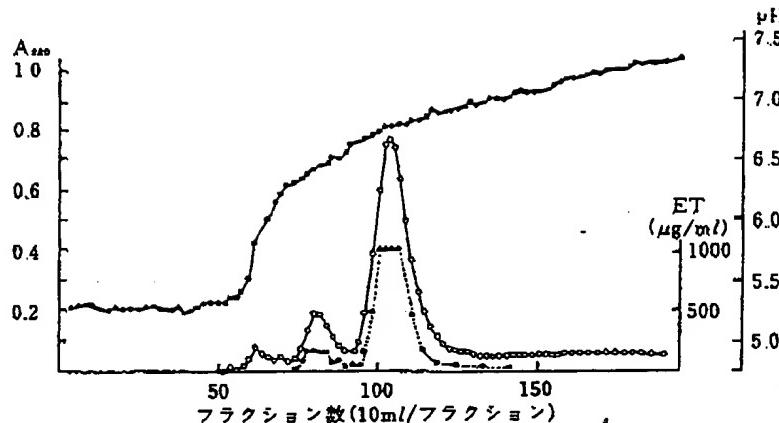
表2 東京都における最近5年間の原因別ブドウ球菌食中毒の発生状況(1984年~1988年)

原因	年度 件数	1984年		1985年		1986年		1987年		1988年		計	
		件数	患者数										
弁当	6	570	2	41	7	43	4	25	3	14	22	693	
にぎりめし	10	407	7	77	6	62	4	25	2	23	29	594	
すし類	2	25	—	—	1	5	—	—	—	—	3	30	
菓子	1	2	—	—	1	7	2	9	—	—	4	19	
その他	3	—	1	—	2	—	3	—	3	—	12	243	
不明	2	4	3	9	2	5	—	—	1	5	8	23	
合計	24	1,019	13	129	19	243	13	153	9	58	78	1,602	

2. ブドウ球菌食中毒の臨床病状

ブドウ球菌食中毒はポツリヌス中毒とともに代表的な毒素型食中毒である。起因物質はエンテロトキシンと呼ばれる毒素である。食物とともに摂取された本毒素は、胃および小腸上部で吸収されると想定されている。吸収された毒素は、嘔吐中枢を刺激して嘔吐を惹起すると考えられている。

本菌食中毒の特徴は、急激に発症し、喫食してから発症までの潜伏時間がきわめて短く、1~5時間(平均すると3時間くらい)である。その主な症状は、唾液の分泌亢進、恶心、嘔吐、腹痛、下痢など、いわゆる胃腸炎症状を呈する。嘔気、嘔吐は、本菌食中毒の主徴である。嘔吐は1~2から10数回の場合もある。患者の症状の違いは、個体の感受性や摂取した毒素量の違いにより異なる。重症例では、下痢回数も多く、



出発材料：*Staphylococcus aureus* 13N-2909株の培養上清20l/分、カラムサイズ：5×37cm、緩衝液：0.01M クエン酸・リン酸緩衝液、pH 5.0；liner gradient elution：1,000mlの0.01M クエン酸・リン酸緩衝液、pH 5.0と1,000mlの0.025M クエン酸・リン酸緩衝液、pH 7.5、流速：100ml/hr シンボルマーク：○—○—○は吸光度 (A 280nm)、●—●—●はRPHA法で定量したエンテロトキシン量、●—●—●はpHを示す。

図1 ブドウ球菌エンテロトキシンAのSP-Sephadex C-25イオン交換クロマトグラフィーパターン

脱水症状や血圧の低下、脈拍微弱などの著明な中毒症状を示し、急救病院に運ばれて治療を受ける場合もある。一般に経過は良好で、1～3日で回復し、予後も良好である。死亡例はほとんどないが、きわめてまれに、他の疾患を有する老人の重症例では、合併症を伴って死亡することもある。本菌食中毒は、一般的にはほとんど発熱を伴わないとされている。しかし、重症例ではまれに発熱を伴うことも知られている。

3. エンテロトキシンの精製

1914年、Barberは、ブドウ球菌食中毒と黄色ブドウ球菌の因果関係について最初に報告した。1930年、Dackは、黄色ブドウ球菌の培養液中にブドウ球菌食中毒を惹起する“エンテロトキシン”と呼称する催吐原性物質が存在することを証明した²⁾。現在のブドウ球菌エンテロトキシンの研究は、Dackから始まったと考えられている。

エンテロトキシンの証明は、研究初期においてはサルやネコを使用する生物学的な方法が用いられていた。その後は抗原抗体反応を利用した免疫学的手法で証明する方法が確立された。そのため、高純度のエンテロトキシンを得ることを目的に精製が行われた。エンテロトキシン

は、抗原性の違いからA, B, C, D, E型の5種類に型別されている。C型は等電点の違いからC₁, C₂, C₃の3型に型別される。

今まで、種々のエンテロトキシン精製法が数多く報告されている。エンテロトキシンの型によって多少の違いがあるが、黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンの産生量が少ないため、それを精製することは非常に困難であると考えられていた。小田^{3,4)}は、SP-Sephadex C-25イオン交換クロマトグラフィーとゲル沪過を組み合せた方法で、比較的容易に精製できる方法を確立した。この精製方法は、今まで数多く報告されてきた方法の中で最も効率の良い優れた方法であると思われる。図1は小田の方法でA型エンテロトキシンを精製したときのSP-Sephadex C-25イオン交換クロマトグラフィーのパターンを示したものである。同様の方法を用いて、各型のエンテロトキシンは容易に精製することが可能となった。精製法の詳細については原著を参照されたい。

4. エンテロトキシンの性状

エンテロトキシンは、抗原性の違いによってA-Eの5種類が存在する。C型は抗原性は同

2 . 385—391. 1989

10 20 30 40
 SEA * SEKSEEINEKDRLRKHSELQGTALE-GLKNIY-YNEKAKT-ENKEBHQFMOH
 SEB * 5QPDPKPDE-HSKFT-LME-HM-VL-DDNHVSA-IVKIYF
 SEC * SQPDPTPDE-HAKFT-LME-HM-VL-DDHVSA-TKVVKVYK
 SEE * RN S-R - - -
 SPE A * QQDQDPDPEQ HRSS VKEQ FL EGDVPH VKVYV LMS
 TSST-1 * STNDNI-KDLLDW-55GSDTF-T SEVLNSZGS
 60 70 80 90
 SEA TILPKGFFTDHSWENDLLVDFDSKDIYDKYHCKKQASLY-A---YYCY-Q
 SEB DLIYSIKD KLGNBDNVR E KN LA BD YVFG- - - - N Y -
 SEC D YNISDKKLKNEDKVKTELLNECLAK DEDEV V SNYVNG FSSKD
 SEE L G P LG ATIN R - - - - -
 SPE A DLIYN--VSVPNEDK KTELKNQEMATLF D N I VVE- - - - HL-Q
 TSST-1 M-----RIKNTDGSIS I IPPSPYYSAPTME E N -----TKRT-K
 100 110 120 130
 SEA G-----ACGTPNKTACGMREGESVLDNNRLTEEKKVPINLWL-DGKQNT
 SEB #YFSKKTNDINSHQ DKRKTIQGEGESQ DKYRSITBRVPE- - -
 SEC N-----V KV TGGXT QGEGEHDNGNLQNVLIRVYEN.R
 SEE S-----
 SPE A Y-----LRENAERS TSI EIP IVVKYSI- I -S
 TSST-1 K-----SNH SEG YIHFPQISGVNTKE PTPIEL LKVXV-H DSP
 140 150 160 170 180 190
 SEA VPLETVKHN V LQA HRYQEKYN NSDVFDGKVQRGLVWHTST
 SEB LSF D-Q S K A YLT SH VVN K K EPN-NSPYETVYK-IE
 SEC IS P - - S E R A S E I K N F E I N K E F N - S S P Y E T V Y K I E N N
 SEE 1 DK - - S E E E H G F C S G S E
 SPE A LSPD-J E M A Y K V K T D N K Q T N C P - S Y E T V Y K N I P K N
 TSST-1 L-KYWP P D Q L A I S T F E I T H Q N T Q I H G R S D - K T Q G Y W K I T M N D G
 200 210 220 230
 SEA EPSVNYLFGAQGQ-YSNT-LDRIRKTINS2NMH D I Y Y S *
 SEB N PW MMMP-P DKFDQSKYMMN MVDKDVKEV T K K K K
 SEC GNTPW-MMP P-DKFDQSKYMMN VDKSVKEVH V K K K N G K
 SEE GST D - PD - - - L L L T K
 SPE A KE FWP PEPF-TQSK-YKME LDWNTSQEV T K
 TSST-1 Y---GS SKKPEY-NTEK-PPINIDEI EA INX

図2. A型コラーゲンとB型コラーゲンの構造上の類似性の検討

図2 A型エンテロトキシンと他の型のエンテロトキシン

Digitized by srujanika@gmail.com

一であるが等電点の違いから C₁, C₂, C₃ の 3 型に型別されている。ゲル内沈降反応においては、A 型と E 型との間で交差反応がみられるが、それ以外では全く認められない。しかし、サルの催吐作用の中和実験において A 型と E 型、B 型と C 型の間で交差反応がみられている。また、感度の高い免疫学的検出法を用いると、各型ともに多少の交差反応を示すことが知られている。

各型のエンテロトキシンの精製標品は、炭水化物、脂質、核酸などを含まない単純蛋白質である。エンテロトキシン A～E の凍結乾燥標品は白色、綿状、吸湿性で、水や種々の塩溶液によく溶ける。エンテロトキシンの結晶化は、試みられてはいるが未だ成功していない。その理由として、エンテロトキシン分子はヘテロジェナイティがあるためと考えられている。表 3 は、エンテロトキシンの分子量、アミノ酸残基数、等電点を示したものである。各エンテロトキシ

表 3 エンテロトキシンの性状

毒 素	分子量	總 殘 基 數	等電點 (pI)	$\frac{1}{2}$ Cys 殘基數
SEA	27078	233	7.2	2
SEB	28366	239	8.6	2
SEC _I	27500	239	8.6	2
SED	27300	236	7.4	2
SEE	26425	230	7.0	2

SEA : エンテロトキシンA型、SEB : エンテロトキシンB型、
SEC₁ : エンテロトキシンC₁型、SED : エンテロトキシンD型、
SEE : エンテロトキシンE型

ンの分子量は28,000±2,000の範囲である。現在まで、エンテロトキシンの一次構造の決定やエンテロトキシン構造遺伝子のDNA配列からアミノ酸配列が明らかにされている。

図2は、1988年、Betley & Mekalonos⁵⁾とCouchら⁶⁾の二つのグループによって報告され

たエンテロトキシンA型に対するエンテロトキシンB, C₁, E, レンサ球菌発熱性毒素（以下SPE Aと略す）および毒素性ショック症候群毒素1（以下TSST-1と略す）のアミノ酸配列の比較を示したものである。これらの配列は、専用のコンピュータプログラムを用いて処理して求められてもある。この図のアミノ酸は一文字法で示されている。エンテロトキシンAのアミノ酸配列に対して、他の毒素のアミノ酸配列が列記されている。アルファベットが記入されていない場合は、第1列のエンテロトキシンAと同じアミノ酸であることを示している。*は各毒素のNまたはC末端アミノ酸を示している。一印は6種類の毒素のアミノ酸配列を比較するために、コンピュータプログラムで作られたもので、ギャップと称されるものである。エンテロトキシンAと4種、5種または6種類の毒素と共に通しているアミノ酸残基のところに、濃度の異なるメッシュを付けた。類似の生物活性を示す6種類の毒素で、アミノ酸配列が共通する部位とほとんど共通性のみられない部位が存在することが明らかになった。

エンテロトキシン分子の生物活性を示す部位はどこかについては、比較的近い将来において解明されるものと期待している。

5. エンテロトキシンの生物活性および作用機序

ブドウ球菌食中毒患者の主な臨床症状は、嘔気、嘔吐、腹痛および下痢である。とくに重篤例では発熱や血圧降下などもみられる。臨床症状は摂取したエンテロトキシン量と患者の感受性の差によって異なる。本菌食中毒ではきわめてまれに死亡することがある。これらの死亡例は幼児か他に疾患を有する老人にみられる。しかし、死亡の原因となるような病理学的所見はどこにも認められない。

1969年、Raj&Bergdoll¹⁷は、ボランティアによるエンテロトキシンBのヒトの発症量を調べた結果、20~25μgであると報告している。ブドウ球菌食中毒の原因食品中に含まれるエンテロトキシン量から逆算して、発症量が推定され

ている。それによれば、感受性の高い人では1μgかそれ以下であることが示唆されている。

エンテロトキシンに対してもっとも感受性の高い動物はヒトで、次がサルである。エンテロトキシンBでは、体重kg当たり、ヒトでは0.4μg、サルでは0.9μgと報告されている。催吐実験には主としてサルが使用される。催吐活性はエンテロトキシンの投与方法によって異なる。静脈内接種では経口投与の約1/10以下の毒素量で、それも経口投与に比べて短時間に発症する。

1965年、Sugiyamaら¹⁸は、赤毛ザルを用いて、ブドウ球菌エンテロトキシンの生物活性の特徴である嘔吐がどのような作用機作によって発現されるかを検討した。その結果によれば、作用部位は腹部臓器にあり、その中のある臓器（器官）のレセプターを介して、エンテロトキシンの刺激は迷走神経と交感神経を経て、脳に存在する嘔吐中枢に達し、中枢神経系を刺激して嘔吐が発現されるとしている。しかしながら、どの臓器または器官がエンテロトキシンと作用するかについては、現在でも全く不明である。このように、エンテロトキシンの催吐作用の機序については不明のまま今日に至っている。

ブドウ球菌食中毒患者は、嘔吐の外に、しばしば下痢を伴う場合が多い。この下痢の発現は、エンテロトキシンの直接作用でなく、食品を汚染している黄色ブドウ球菌が生体内で産生したβ-溶血素やその他の菌体外毒素の関与によるものと考えられている。その理由として、コレラ菌や毒素原性大腸菌の産生するエンテロトキシンの検出に使用されているチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、毛細血管透過性などの実験系に対して、精製エンテロトキシンは全く影響しないことがあげられている。このように、ブドウ球菌食中毒の発症機序については、全く解明されていないのが現状である。

最近、胃の腫瘍摘出などの外科的手術を受けた患者が激しい水様性の下痢を起こすことが報告されている。これらの患者の糞便からはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）がほとんど純培養に検出される。この分離される黄色ブドウ球菌の多くは、エンテロトキシンCと

TSST-1を産生する。そのため、これらの毒素が下痢の主たる原因物質と想定されている。しかし現在では、その下痢発症機序については全く不明である。

その他、エンテロトキシンの生物活性としては、発熱作用、内毒素の致死増強作用、T細胞マイトジエン活性などが知られている。エンテロトキシンが示す種々の生物活性は、それぞれ別々の作用機序によって発現されるのか、何か共通した作用機序によって発現されるのか、今後の研究の発展に期待される。

6. エンテロトキシンの検出

これまで、ブドウ球菌食中毒の起因物質であるエンテロトキシンを検出するための種々の方法が報告されている。私どもは、ブドウ球菌食中毒の検査において、従来の黄色ブドウ球菌の検査を実施しながら、同時に、本菌食中毒の特徴を利用した、ブドウ球菌食中毒の原因食品からエンテロトキシンを直接、正確に、そして簡易・迅速に検出する方法の開発を行ってきた¹⁾。その結果、特殊な検査施設や高価な検査機器を必要としないエンテロトキシンの検出法として、逆受身ラテックス凝集反応であるRPLA法を確立した。RPLA法で原因食品からエンテロトキシンを検査すると、A-E型のいずれかの型に型別されると同時に、その試料に含まれている毒素量が判明する。この方法の最少検出量は0.5~1.0ng/mlである。初期に開発したRPLA法の反応時間は12~16時間であった。しかし、最近、高比重のラテックスを使用するRPLA法を開発した。その反応時間は3時間である。

RPLA法の概要を以下で記す。精製エンテロトキシンA~E型をウサギに免疫して、各型のエンテロトキシン抗血清を調製する。この抗血清から、精製エンテロトキシンをリガンドとしたアフィニティーカラムを用いて、型特異免疫グロブリンを精製した。この精製免疫グロブリンを高比重ラテックス粒子(Immutex H1011 CR, HD-PS, 日本合成ゴム(株))に結合した感作ラテックスを作製する。このようにして、エンテロトキシンの各型の感作ラテックスを調製

する。

ブドウ球菌食中毒の原因食品からエンテロトキシンを検出する場合は、5倍または10倍の食品懸濁液を調製し、その約5mlを12,000rpm、10分間、冷却遠心し、その上清をエンテロトキシンの検出のための出発材料とする。この出発材料を小試験管で0.5mlずつの2倍連続希釈を行う。希釈液には、生理的リン酸緩衝液(pH7.2)に0.5%のウシ血清アルブミンを加えたRPLA用希釈液を用いる。2倍連続希釈を行った試料をマイクロタイタープレートの5列に1滴ずつ滴下する。このようにして5列の1滴ずつ滴下した希釈系列を作り、その各希釈系列にそれぞれ各型のエンテロトキシン免疫グロブリン感作ラテックスを1滴ずつ滴下後、十分攪拌する。このプレートは湿润箱に入れる。室温で3時間反応した後にその凝集像を判読する。凝集を示した感作ラテックスと同じエンテロトキシン型が、その試料の毒素型である。毒素量は、凝集を示した最大希釈倍数の逆数がその試料中に含まれる毒素量である。

黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生性を試験する場合は、ブレーンハートインヒューション液体培地に供試菌株を接種し、35℃、18~24時間振盪培養する。培養液を12,000rpm、10分間、冷却遠心した上清を出発材料とする。培養上清の希釈液の場合は、50μlと450μlの10倍連続希釈系列を作製する。その他の手順は食品の場合と同様である。

このRPLA法を用いることで、ブドウ球菌食中毒の原因食品や分離菌株から、比較的容易にエンテロトキシンを検出することが可能となっている。エンテロトキシン検出用のRPLA法のキットがデンカ生研^(株)より市販されている。このキットは反応時間が12~16時間である。

実際に、東京都において、最近5年間に発生したブドウ球菌食中毒78件のエンテロトキシン型について調査した結果、A型34件、B型11件、D型4件、AB型12件、AD型5件であった。C型とE型によるブドウ球菌食中毒はみられなかった。A型と関連しているものは、単独のものを含めて78件中51件(65.4%)であった。

～わりに

本項は細菌毒であるが、著者の勝手な判断から、ブドウ球菌食中毒とその原因物質であるエンテロトキシンについてのみ記述した。その他の細菌毒については、新しい企画が検討されていることを聞いているので、それに期待していただきたいと思います。

最近の研究では、エンテロトキシンは単にブドウ球菌食中毒の起因物質であるばかりではない。ブドウ球菌感染症の一様である toxic shock syndrome (TSS) の起因物質として、TSST-1 と同様にエンテロトキシンも想定されている。TSS の発症機序については解明されていない。しかし、TSST-1 やエンテロトキシンは主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) のコードする分子のうちクラス II 分子を表現している細胞に結合し、T 細胞の活性化を誘導することが明らかにされている¹⁰⁾。TSS では、黄色ブドウ球菌が大量の毒素を産生し、それが生体に導入されれば、T 細胞は大量の種々のリソフォカインを産生する。これが生体のバランスを大きく崩すことになり、そのことが疾病を惹起していることも想定される。今後、エンテロトキシンの研究は、この方向の研究に向って進行するものと考えている。その結果として、今まで解明されていない種々の生物活性の作用機序が明らかにされることを期待している。

文 献

- 1) 東京都衛生局環境衛生部：東京都の食中毒概

- 要, 1984, 1985, 1986, 1987, 1988.
2) Dack, G. M., Cany, W. E., Woolpert, O., Wiggers, H. J. : A outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow hemolytic *Staphylococcus*. *J. Prev. Med.*, 4, 167(1930)
3) 小田隆弘 : SP-Sephadex クロマトグラフィーを用いたブドウ球菌エンテロトキシン A, B, C₁ の簡易精製, *日細菌誌*, 33, 743~752(1978)
4) 小田隆弘 : SP-Sephadex クロマトグラフィーを用いたブドウ球菌エンテロトキシン D および E の簡易精製, *日細菌誌*, 35, 559~567(1980)
5) Betley, M. J., Mekalanos, J. J. : Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.*, 170, 34~41(1988)
6) Couch, J. L., Soltis, M. T., Betley, M. J. : Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.*, 170, 2954~2960(1988)
7) Raj, H. D., Bergdoll, M. S. : Effect of enterotoxin on human volunteers. *J. Bacteriol.*, 98, 833~834(1969)
8) Sugiyama, H., Hayama, T. : Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in monkey. *J. Inf. Dis.*, 115, 330~336(1965)
9) Fujikawa, H., Igarashi, H. : Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2345~2348(1988)
10) 内山竹彦, 今西健一 : ブドウ球菌外毒素 TSS 毒素-1 とエンテロトキシン群の生物活性—毒素性ショック症候群との関連性について—, 臨床と微生物, 16, 47~57(1989).